昆虫学报 Acta Entomologica Sinica，December 2002，45（6）：711－716　ISSN 0454-6296

美国白蛾核型多角体病毒 *p*35 基因的克隆及序列分析

曹广力，薛仁宇，朱越雄，魏育红，贡成良*
（苏州大学生命科学学院，苏州　215006）

摘要：对美国白蛾核型多角体病毒（HycuNPV，*Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus）*p*35 基因的序列分析表明：HycuNPV *p*35 编码序列 900 bp，编码 299 氨基酸。同源性分析表明：HycuNPV *p*35 与 BomoNPV T3、AucaNPV、SpliNPV、LeseNPV、HearNPV 在核苷酸水平上为 99.9%、95.7%、93.6%、80.2%和 87.2%，在氨基酸水平上为 99.7%、90.3%、77%、64.9%和 73.2%，显示了杆状病毒 *p*35 基因在进化上的保守性。BomoNPV T3 中位的 H^{122}，在 HycuNPV 中被 R 取代。推测 HycuNPV *p*35 蛋白的功能及抑制细胞凋亡的能力与 BomoNPV T3 *p*35 蛋白的相似。

关键词：美国白蛾核型多角体病毒；*p*35 基因；核苷酸序列
中图分类号：Q965.8；Q75　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2002）06-0711-06

Cloning and nucleotide sequence analysis of the *p*35 gene of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus

CAO Guang-Li，XUE Ren-Yu，ZHU Yue-Xiong，WEI Yu-Hong，GONG Cheng-Liang*（Life Science College of Suzhou University，Suzhou　215006，China）

Abstract: Sequence analysis of the *p*35 gene of *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus（HycuNPV）showed that the HycuNPV *p*35 gene was 900 bp and encoded 299 amino acids. Compared with BomoNPV T3，AucaNPV，SpliNPV，LeseNPV and HearNPV，nucleotide and amino acid identity were 99.9%，95.7%，93.6%，80.2%，87.2% and 99.7%，90.3%，77%，64.9%，73.2% respectively，and showed evolutionary conservation. H^{122} of BomoNPV T3 *p*35 was replaced by R in HycuNPV *p*35. It is possible that the function and anti-apoptotic action of HycuNPV *p*35 is similar to that of BomoNPV T3 *p*35.

Key words: *Hyphantria cunea* nucleopolyhedrovirus；*p*35 gene；nucleotide sequence

核型多角体病毒（nucleopolyhedrovirus，NPV）属杆状病毒科成员，病毒粒子具有囊膜，病毒核酸为环状双链 DNA。目前 NPV 已发展成为一种比较成熟的真核基因表达载体，在细胞、昆虫中表达了数百种外源基因。细胞凋亡（apoptosis）是多细胞有机体为调控机体发育，维护内环境稳定，由基因控制的细胞主动死亡过程，在多种生物学过程中都有发现，杆状病毒基因组中也存在有细胞凋亡基因，如 *p*35 基因和 *iap* 基因。当用缺失 *p*35 基因的苜蓿银纹夜蛾 NPV（AucaNPV，*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus）感染 SF-21 细胞时，就可以观察到明显的细胞凋亡现象（Clem *et al*.，1991）。对 AucaNPV 的 *p*35 基因序列分析表明：该基因翻译起始位点上游同时具有杆状病毒早期启动子、晚期启动子的基序，编码 35 kD 蛋白，其功能与编码细胞凋亡抑制蛋白的 *iap* 基因相似（Crook *et al*.，1993），能抑制病毒感染所诱导的细胞凋亡，为负相调节基因。*p*35 基因及其在不同昆虫细胞中的功能可能是多样的。家蚕核型多角体病毒 T3 株（BomoNPV T3，*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus T3 strain）也具有 *p*35 基因，也能在阻止 BmN 细胞凋亡中起作用，但当用 *p*35 基因缺失的 BomoNPV 突变系感染时，部分细胞发生了凋亡，而另一些细胞则能充分支持病毒的复制（Kamita *et al*.，1993）。为了进一步研究 *p*35 基因的变异及功能，我们对美国白蛾核型多角体病毒（*Hyphantria cunea* nucleopoly-

作者简介：曹广力，男，1964 年 3 月生，副教授，主要从事分子生物学研究，E-mail：guanglicao@sina.com
* 通讯作者 Author for correspondence
收稿日期 Received：2001-09-03；接受日期 Accepted：2002-01-15

hedrovirus，HycuNPV）的 *p*35 基因进行了克隆及序列分析，并与其它 NPV*p*35 基因进行了比较。

1 材料和方法

1.1 细胞株、病毒、质粒

SPIM 细胞、HycuNPV 由日本三重大学分子生物工学实验室提供，本实验室保存；*E. coli* 的 TG_1 菌株、测序质粒载体 pBluescript Ⅱ SK（+）（Amp^r）由中国科学院上海生物化学研究所提供，本实验室保存。

1.2 试剂

T_4 DNA 连接酶、限制性内切酶及其它试剂购于 GIBCO BRL 公司，高保真 Taq 酶购于上海生工生物技术服务有限公司。

1.3 引物设计

根据 BomoNPV T3 株 *p*35 序列（Kamita *et al*., 1993），通过计算机辅助设计一对引物，由上海生工生物技术服务有限公司合成。引物分别为：

*P*35-1：5′-CAGGATCCATGTGTGTAATTTTTCC-3′

*P*35-2：5′-AATCTAGACATCTCAAATCTTGCG-3′

1.4 病毒 DNA 的制备

收集病毒感染的 SPIM 细胞培养液，8 000 r/min 离心 10 min，上清液用 SW-27 转子 24 000 r/min 超离 30 min；将沉淀的病毒粒子悬于 1 mL 的 TE（pH 8.0）中，加蛋白酶 K 至终浓度为 50 μg/mL，50℃水浴 2 h；再加 Sarcosyl 至终浓度为 1%，50℃水浴 2 h；用等体积过饱和酚、氯仿/异戊醇（24∶1）各抽提一次，12 000 r/min 离心 5 min，上清加入 2.5 倍体积的 95% 冷乙醇，DNA 呈絮状沉淀，用玻璃棒搅出，70% 的乙醇洗涤一次，自然蒸发残余乙醇，溶于适量 TE 中；电泳检查，4℃放置待用。

1.5 克隆与测序

用 HycuNPV DNA 作为模板，进行 PCR 体外扩增。PCR 扩增条件为：94 ℃ 1 min，50℃ 1 min，72℃ 1.5 min，共 30 个循环。PCR 产物经低融点琼脂糖回收后，用 *Bam*HⅠ、*Xba*Ⅰ双酶切，克隆进 pBluescript Ⅱ SK（+）的 *Bam*HⅠ、*Xba*Ⅰ位点，经 *Sal*Ⅰ、*Bam*HⅠ、*Xba*Ⅰ等酶切鉴定后，由上海生工生物技术服务有限公司双向自动测序。克隆策略见图 1。

1.6 同源性分析

应用 PC/gene（ver 6.8 Intelli Genetics）Clustal 程序进行。

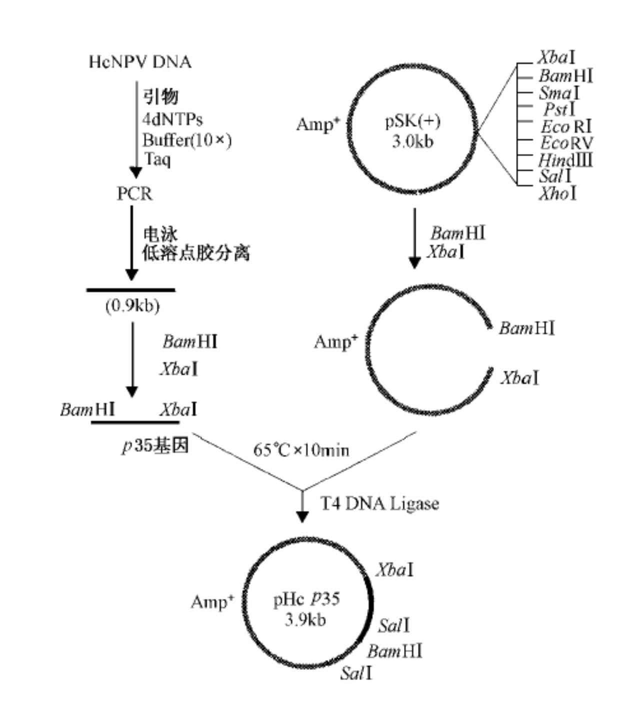


图 1 克隆策略

Fig. 1 Construction of clon vector

2 结果和分析

2.1 HycuNPV 基因的核苷酸序列

PCR 产物经低融点琼脂糖回收后，克隆进 pBluescript Ⅱ SK（+）的 *Bam*HⅠ、*Xba*Ⅰ位点，经 *Sal*Ⅰ、*Bam*HⅠ+*Xba*Ⅰ、*Sal*Ⅰ+*Xba*Ⅰ等酶切鉴定（图 2）后，由上海生工生物技术服务有限公司自动测序。

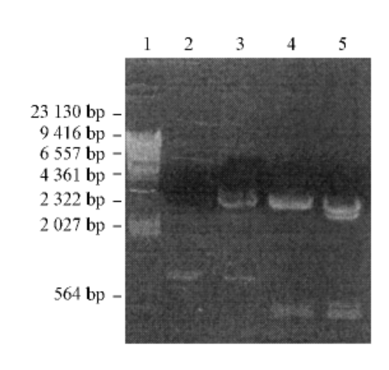


图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction detection of recombinant vector

1：标准 mark，λDNA/*Hin*dⅢ；2：PCR 产物 the purified PCR products；3：*Bam*HⅠ+*Xba*Ⅰ；4：*Sal*Ⅰ；5：*Sal*Ⅰ+*Xba*Ⅰ

HycuNPV *p*35 基因的核苷酸序列如图 3 所示。HycuNPV *p*35 基因编码序列为 900 bp，编码 299 氨

```
ATGTGTGTAATTTTTCCGGTAGAAATCGACGTGTCCCAGACGGTTATTCGAGATTGTCATGTGGACGAACAAACCAGAGAGTTGGTGTAC 90
M  C  V  I  F  P  V  E  I  D  V  S  Q  T  V  I  R  D  C  H  V  D  E  Q  T  R  E  L  V  Y  30
ATTAACAAGATTATGAACACGCAATTGACAAAACCCGTTCTCATGATGTTTAACATTTCGGGTCCTATACGAAGCGTTACGCGCAAGAAC 180
I  N  K  I  M  N  T  Q  L  T  K  P  V  L  M  M  F  N  I  S  G  P  I  R  S  V  T  R  K  N  60
AACGATTTGCGCGACAGAATAAAATCAAAAGTCGATGAACAATTTGATCAACTAGAACGCGAATACAGCGATAAAATTGATGGATTTCAC 270
N  D  L  R  D  R  I  K  S  K  V  D  E  Q  F  D  Q  L  E  R  E  Y  S  D  K  I  D  G  F  H  90
GATAACATCCAGTATTTTAAAGATGAACACTATTCGGTAAGTTGCCAAAATGGCAGCGTGTTGAAAAGCAAGTTTGCTAAAATTTTAAAA 360
D  N  I  Q  Y  F  K  D  E  H  Y  S  V  S  C  Q  N  G  S  V  L  K  S  K  F  A  K  I  L  K  120
AGTCGTGATTATACCGATAAAAAGTCTATTGAAACTTACGAAAAATACTGTTTGCCCCAATTGGTCGACAAACACAACGACTGCTACGTG 450
S  R  D  Y  T  D  K  K  S  I  E  T  Y  E  K  Y  C  L  P  Q  L  V  D  K  H  N  D  C  Y  V  150
GCGGTATGCGTGTTGAAGCCGGGATTTGAGAACGGCAGCAACCAAGTGCTATCTTTTGAGTACAACCCGATTGGTAACAAAGTTATTGTG 540
A  V  C  V  L  K  P  G  F  E  N  G  S  N  Q  V  L  S  F  E  Y  N  P  I  G  N  K  V  I  V  180
CCGTTTGCTCACGAAATTAACGACACGGGACTTTACGAGTACGACGTCTTAGCTTACGTGGACAGTGTGGAGTTTGATGGCAAACAATTT 630
P  F  A  H  E  I  N  D  T  G  L  Y  E  Y  D  V  L  A  Y  V  D  S  V  E  F  D  G  K  Q  F  210
GAAGAGTTTGTACAAAAAATTAATATTGCCGTCGTCGTTCAACGATTCGGAAAAGGTTTTATATTACAACGAAGCGTCGAAAAACAAAAAC 720
E  E  F  V  Q  K  L  I  L  P  S  S  F  N  D  S  E  K  V  L  Y  Y  N  E  A  S  K  N  K  N  240
ATGATCTACAAGGCTTTGGAGTTTACTACAGAATCGAGCTGGGTCAAATCCAACAAGTTTAATTGGAAAATTTTTTGTAACGGTTTTATT 810
M  I  Y  K  A  L  E  F  T  T  E  S  S  W  V  K  S  N  K  F  N  W  K  I  F  C  N  G  F  I  270
TATGATAAAAAATCAAAAGCGTTGTATGTTAAATTGCACAATGTAACTAGTACACTCAACAAAAATGTAATATTAGACATGATTAAATAA 900
Y  D  K  K  S  K  A  L  Y  V  K  L  H  N  V  T  S  T  L  N  K  N  V  I  L  D  M  I  K  ·  299
ATGTTAAAATTTATTGCCTAATATTATTCTTTGTCATTGCTTGATCGTGTTTTACGAATATAATTCTACTCGTAACGCAAGATTTGAGATG 991
```

图 3　HycuNPV *p*35 基因的核苷酸序列以及推测的氨基酸序列

Fig. 3　HycuNPV *p*35 nuclear acid sequence and its predicted amino acid sequence

下划线表示以 BomoNPV T3 的 *p*35 基因设计的引物序列

Primer sequence underlined was designed for BomoNPV T3 *p*35

基酸，与 BomoNPV T3（Kamita *et al*.，1993）、AucaNPV（Clem *et al*.，1991）、HearNPV（*Heliothis armigera* nucleopolyhedrovirus，棉铃虫 NPV，GenBank 登记号为 AF063105）一样，比 SpliNPV（*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus，斜纹夜蛾 NPV，GenBank 登记号为 Y10254）的 *p*35 基因多 9 bp，即多 3 个氨基酸残基，比 LeseNPV（*Leucania separata* nucleopolyhedrovirus，粘虫 NPV，GenBank 登记号为 AF068929）的 *p*35 基因少 9 bp，即少 3 个氨基酸残基。

2.2　同源性分析

应用 PC/gene（ver 6.8 Intelli Genetics）Clustal 程序对 HycuNPV、BomoNPV T3、AucaNPV、SpliNPV、LeseNPV、HearNPV 的 *p*35 基因进行同源性分析，结果如图 4 和图 5 所示。HycuNPV *p*35 与 Bomo NPV T3、AucaNPV、SpliNPV、LeseNPV、HearNPV 在核苷酸水平上同源性分别为 99.9%、95.7%、93.6%、80.2%和 87.2%，在氨基酸水平上的同源性分别为 99.7%、90.3%、77%、64.9% 和 73.2%，表现出杆状病毒 *p*35 基因在进化上的保守性。HycuNPV 与 BomoNPV 为不同病毒，在核苷酸水平、氨基酸水平都表现出很高的同源性。应用 Chou-Fasman 和 GOR 法分析表明，杆状病毒的 *p*35 不仅在一级结构上同源性较高，而且在二级结构上也呈非常好的保守性。

对已知的一些杆状病毒的 *p*35 基因进行对比进化分析发现，HycuNPV 与 BomoNPV 处于同一分枝，这与来自于 HycuNPV 的其它基因的进化分析结果一致（曹广力等，2001；贡成良等，1998，1999）。从分子水平研究杆状病毒的进化机制是杆状病毒研究的一个重要内容，NPV *p*35 基因是一个比较保守的基因，我们用 *p*35 基因比较了几种杆状病毒的亲缘关系，与 NPV 的多角体蛋白基因（*ocu*）等基因在进化树中遗传关系上一致。

```
HC  ATGTGTGTAATTTTTC CGGTAGAAATCGACGTGTCCCAGACGGTTATTCGAGATTGTCATGTGGACGAACAAACCAGAGAGTT  83
T3  ATGTGTGTAATTTTTC-CGGTAGAAATCGACGTGTCCCAGACGGTTATTCGAGATTGTCATGTGGACGAACAAACCAGAGAGTT  83
AC  ATGTGTGTAATTTTTC CGGTAGAAATCGACGTGTCCCAGACGATTATTCGAGATTGTCAGGTGGACAAACAAACCAGAGAGTT  83
HA  ATGTGTGTAATTTTTC-CGGTAGATTTCGACGTGTCCCAGACGATTTTTCGAGATTGTCAGGTGGACAAACAAACCAGAGAGTT  83
SL  ATGTGTGTAATTTTTCGCGGTAGAAATCGACGTGTCC-AGACGATTAT CGAGATTGTCAGGTGGACAA-CAA-CCAGAGAGTT  80
LS  ATGTGTGTAATTTTTC-CGGTAGAAGTCCATGTATCCCAACCGATTATTCGAGATTGTCAGGTGGACAAACAAACCAGAGAGTT  83
    **************** *******..** * **.*** *.  **.**.* ***********.******.* *** **********
HC  GGTGTACATTAACAAGATTATGAACACGCAATTGACAAAACCCGTTCTCATGATGTTTAACATTTCGGGTCCTATACGAAGCGT 167
T3  GGTGTACATTAACAAGATTATGAACACGCAATTGACAAAACCCGTTCTCATGATGTTTAACATTTCGGGTCCTATACGAAGCGT 167
AC  GGTGTACATTAACAAGATTATGAACACGCAATTGACAAAACCCGTTCTCATGATGTTTAACATTTCGGGTCCTATACGAAGCGT 167
HA  GGTGTACATCAACAAGATTATGAACACGCAATTGACAAAACCCGTTCTCATGATGTTTAACTTTTCGGGTCCTATACGAAGCCT 167
SL  G-TGTACAT  ACAGA  TATGAAC-CACAATTGACAAAACCCGTTCTCATGATGTTTAACATTTCGGGTCCTATACGAACGGT 158
LS  GGTGTACATTAACAAGACCACGAACACGCAACCGACAAAACCCGTTCTCACGATGTTTAACATTTCGGGCCCTATACGAAGCGA 167
    * *******  ***..     * **** *.***  **************** **********.******* **********    .
HC  TACGCGCAAGAACAACGATTTGCGCGACAGAATAAAATCAAAAGTCGATGAACAATTTGATCAAC-TAGAACGCGAATACAGCG 250
T3  TACGCGCAAGAACAACGATTTGCGCGACAGAATAAAATCAAAAGTCGATGAACAATTTGATCAAC-TAGAACGCGAATACAGCG 250
AC  TACGCGCAAGAACAACAATTTGCGCGACAGAATAAAATCAAAAGTCGATGAACAATTTGATCAAC-TAGAACGCGATTACAGCG 250
HA  TACGCGCAAGAACCACAATTTGCGCGGCAGAATAAAATCAAAAGTCGAAGAACAATTGGATCAAC TAGAACGGGATTACAGCG 250
SL  TACGCGCAAGAACAACAATTTGCGCGACAGAATAAAATCAAAAGTCGATGAACAATT GATCAACCTAGAACGCGATTACAGCG 241
LS  AACGCGCAAGAACAAGTTTAAGCGCGACAGAATAAAATCAAAAGAACACGAACAATTTGATCCGC-TACAACGCGATTCGAGCG 250
    .************ * ..*..*****.*****************.   * ******** **** .* ** **** **.*.  ****
HC  ATAAAATTGATGGATTTCACGATAACATCCAGTATTTTAAAGATGAACACTATTCGGTAAGTTGCCAAAATGGCAGCGTGTTGA 334
T3  ATAAAATTGATGGATTTCACGATAACATCCAGTATTTTAAAGATGAACACTATTCGGTAAGTTGCCAAAATGGCAGCGTGTTGA 334
AC  ATCAAATGGATGGATTCCACGATAGCATCAAGTATTTTAAAGATGAACACTATTCGGTAAGTTGCCAAAATGGCAGCGTGTTGA 334
HA  ATCAATTGGTTGGATTCCAAGTTAGCATCAAGTATTTTCAAGATGCCCAATATTGGGAAAGTTGCCAAATTGGCAGCGTGTTGA 334
SL  ATCAAATGGATGGATTCCACGATAGCATCAAGTATTTTAAAGATGAACACTATTCGGTAAGTTCGCAAAATGGCAGCGTGTTGA 325
LS  ATCAAATGGGTGGATTCCACCATAGCATCAAGTATTTTAGGGATGAACACTATTCGGTACGTTGCCAAAACCGCAGCGTGTTTA 334
    ** **.*.*.****** **   .**.**** ******** ..****  ** **** **.* ***  ****.   *********.*
HC  AAAGCAAGTTTGCTAAAATTTTAAAAAGTCGTGATTATACCGATAAAAAGTCTATTGAAA CTTAC GAAAAATACTGTTTGCC 416
T3  AAAGCAAGTTTGCTAAAATTTTAAAAAGTCATGATTATACCGATAAAAAGTCTATTGAAA CTTAC-GAAAAATACTGTTTGCC 416
AC  AAAGCAAGTTTGCTAAAATTTTAAAGAGTCATGATTATACCGATAAAAAGTCTATTGAAG-CTTAC-GAGAAATACTGTTTGCC 416
HA  AAAGCAAGTTTGCTAAAATCTCAAAGAGTCATCATTATACCGATAAAAAGTCTATTGAAG-CTTAC GAGAAATACTGTTTGCC 416
SL  AAAGCAAGTTTGCTAAAATTTTAAAGAGTCAGGATTATACCGATAAAAAGTCTATTGAAGTCTTACTGAGAAATACTGTTTGCC 409
LS  AAAGCAAGTTTGGTAAAATTTTACAGAGTCATGATTATGCCGATAAGAAGTGTATTGAAG-CTTAC-GGGAAATTCTTTTTGCC 416
    ************ ****** * * *.****.. *****.*******.****.**************. ***** *..****.**.******
HC  CCAA TTGGTCGACAAACACAACGACTGCTACGTGGC       GGTATGCGTGTTGAAGCCGGGATTTGAGAACGGCAGCAACC 493
T3  CCAA-TTGGTCGACAAACACAACGACTGCTACGTGGC ---- GGTATGCGTGTTGAAGCCGGGATTTGAGAACGGCAGCAACC 493
AC  CAAA TTGGTCGACGAACGCAACGACTACTACGTGGC------GGTATGCGTGTTGAAGCCGGGATTTGAGAACGGCAGCAACC 493
HA  CAAA-TTGGTCGACGAACGCAACGAGTACTACGTGGC----- GGTATGCGTGTTGAAGCCGGGATTAGAGAACGGCAGCAACC 493
SL  CAAACTTGGTCGACGAACGCAACGACTACTACGTGGC----- GGTATGCGTGTTGAAGCCGGGATTTGAGAACGGCAGCAACC 487
LS  CAAATTTGGCC-AC---CGCAGCGGCTTCTACGTGGCCTTGGCGGTATCAGTATGGAAGCCAGGCTTGGAGAACAGCAGCTTCC 496
    * ** **** * **    *.**.**. *.*********      *****   **.*.******.** **.******.*****..**
HC  AAGTGCTATCTTTTGAGTACAACCCGATTGGTAACAAAGTTATTGTGCCGTTTGCTCACGAAATTAACGACACGGGACTTTACG 577
T3  AAGTGCTATCTTTTGAGTACAACCCGATTGGTAACAAAGTTATTGTGCCGTTTGCTCACGAAATTAACGACACGGGACTTTACG 577
AC  AAGTGCTATCTTTCGAGTACAACCCGATTGGTAACAAAGTTATTGTGCCGTTTGCTCACGAAATTAACGACACGGGACTTTACG 577
HA  AAGTGCTATCTTTCGAGTACCACCCGATTGGTAACAAAGTTATTGTGCCGTTTGCTCACGAAATGAACGCCACGGGCCTTCACG 577
SL  AAGTGCTATCTTTCGAGTACAACCCGATTGGTAACAAAGTTATTGTGCCGTTTGCTCACGAAATTAACGACACGGGACTTTACG 571
LS  AAGTGCTATCTTTCGAGTACAACCCGGATTGTTACAAAGTTATTGTGCCGTTTGGTCACGAAATTGGCGTCACGGGATGTTTAG 580
    ************* ****** *****..*.**.********************* *********...** ******   .*  . *
HC  AGTACGACGTCTTAGCTTACGTGGACAGTGTGGAGTTTGATGGCAAACAATTTGAAGAGTTTGTACAAAAATTAATATTGCCGT 661
T3  AGTACGACGTCTTAGCTTACGTGGACAGTGTGGAGTTTGATGGCAAACAATTTGAAGAGTTTGTACAAAAATTAATATTGCCGT 661
AC  AGTACGACGTCGTAGCTTACGTGGACAGTGTGCAGTTTGATGGCGAACAATTTGAAGAGTTTGTGCAGAGTTTAATATTGCCGT 661
HA  GGTACGCCGTCGTAGCTTACGTTGACAGTGTGCAGTTTGATGGCGAACAAGCCGAGGAGCTTGTGCAGAGTTTAATTTGGCCGT 661
SL  AGTACGACGTCGTAGCTTACGTGGACAGTGTGCAGTTTGATGGCGAACAATTTGAAGAGTTTGTGCAGAGTTTAATATTGCCGT 655
LS  ACGACGACGTCGCAGCGAAGCAGGACAGTGTCGAGGAAGAGCGCGCAAAGGCGGAAAACCGCGTGCAGAGTTTAA   TGCCGC 661
    . .*** ****. ***..*  .********  **...**...**.**. .**.**.*..**.**.*..****      .****
HC  CGT-CG--TTCAACGATTCGGAAAAGGTTTTATATTACAACGAAGCGTCGAAAAACAAAAACATGATCTACAAGGCTTTGGAGT 742
T3  CGT-CG--TTCAACGATTCGGAAAAGGTTTTATATTACAACGAAGCGTCGAAAAACAAAAACATGATCTACAAGGCTTTGGAGT 742
AC  CGT-CG--TTCAAAAATTCGGAAAAGGTTTTATATTACAACGAAGCGTCGAAAAACAAAAGCATGATCTACAAGGCTTTAGAGT 742
HA  CGT CG  GTCCTGAGTTCGGCAAAGGTTTTATATGCTGGCGAAGCGCCGGCCTCCACGCGCATGATCTACAAGGCTTTAGAGT 742
SL  CGTTCG--TTCAA--AATCGGAAA--GTTTTATATTACAACGAAGCGTCGAAAAACAAAAGCATGATCTACAAGGCTTTAGAGT 733
LS  CGTGCTGCTTCAAAAATTCGGAAAACCTTTTGTCTTGGGGCGAAGCGTCGAAAAACAAAAGCATGTGGTACAACCCAAAAGAGT 745
    *** *.  .**  .  ..**** **   ****.* *.  ..******* **.   . **  . .****.. *****  *...****
HC  TTACTACAGAATCGAGCTGGGTCAAATCCAACAAGTTTAATTGGAAAATTTTTTGTAACGGTTTTATTTATGATAAAAAATCAA 826
T3  TTACTACAGAATCGAGCTGGGTCAAATCCAACAAGTTTAATTGGAAAATTTTTTGTAACGGTTTTATTTATGATAAAAAATCAA 826
AC  TTACTACAGAATCGAGCTGGGGCAAATCCGAAAAGTATAATTGGAAAATTTTTTGTAACGGTTTTATTTATGATAAAAAATCAA 826
HA  TTACTACAGAAACGAGCTGGGGCAAATCCGAAAAGTATAATTGGAGAATCTTCTGTAACGGTCGTATTTATGATCAAAAACCAA 826
SL  TTACTACAGAATCGAGCTGGGGCAAATCCGAAAAGTATAATTGGAAAATTTTTTGTAACGGTTTTATTTATGATAAAAAATCAA 817
LS  TTACTACAGAATGCAGATGGCCCAAATCCCAAAACAATAATTGGAAAATTTTTTGTAACCGTTTTATTTATGATAAAAAAAGAA 829
    ***********.   ** ***   ******* * **  ..*********.*** ** ****** **  .********** *****   **
HC  AAGCGTTGTATGTTAAATTGCACAATGTAACTAGTACACTCAACAAAAATGTAATATTAGACATGATT------AAATAA    900
T3  AAGCGTTGTATGTTAAATTGCACAATGTAACTAGTACACTCAACAAAAATGTAATATTAGACATGATT------AAATAA    900
AC  AAGTGTTGTATGTTAAATTGCACAATGTAACTAGTGCACTCAACAAAAATGTAATATTAAACACAATT------AAATAA    900
HA  AAGTGGTGTATGTTAAATTGCACAATGGAACTAGTGCACTCAAGAGAAATGCAATATCAAACACAAGT--    AAATAA    900
SL  AAGTGTTGTATGTTAAATTGCACAATGTAACTAGTGCACTCAACAAAAATGTAATATTAAACACAATT------AAATAA    891
LS  AAGTGTTGTATGTTAAATTGCACAATGTAACTAGTGCACTCAACAAAAATGTTATATTTAACACAATTTTTTTAATGTAA    909
    *** *.*******************.*******.******* *.***** .**** ..*** .*.*       *..***
```

图4 杆状病毒 *p*35 基因核苷酸序列同源性比较

Fig. 4 Homology analysis on the *p*35 nuclear acid sequence of baculovirus

HC、T3、AC、HA、SL、LS: HycuNPV *p*35、BomoNPV T3 *p*35、AucaNPV *p*35、HearNPV *p*35、SpliNPV *p*35、LeseNPV *p*35 基因核苷酸序列

HC, T3, AC, HA, SL, LS: Nuclear acid sequence of HycuNPV *p*35, BomoNPV T3 *p*35, AucaNPV *p*35, HearNPV *p*35, SpliNPV *p*35, LeseNPV *p*35

```
HC  MCVIFPVEIDVSQTVIRDCHVDEQTREL-VYINKIMNTQLTKPVLMMFNISGPIRSVTRKNNDLRDRIKSKVDEQFDQLEREY  82
T3  MCVIFPVEIDVSQTVIRDCHVDEQTREL-VYINKIMNTQLTKPVLMMFNISGPIRSVTRKNNDLRDRIKSKVDEQFDQLEREY  82
AC  MCVIFPVEIDVSQTIIRDCQVDKQTREL-VYINKIMNTQLTKPVLMMFNISGPIRSVTRKNNNLRDRIKSKVDEQFDQLERDY  82
HA  MCVIFPVDFDVSQTIFRDCQVDKQTREL-VYINKIMNTQLTKPVLMMFNFSGPIRSLTRKNHNLRGRIKSKVEEQLDQLERDY  82
SL  MCVIFRGRNRRVQTIIEIVRWTT-TRELCTYRY ---EPQLTKPVLMMFNISGPIRTVTRKNNNLRDRIKSKVDEQLINLERDY  79
LS  MCVIFPVEVHVSQPIIRDCQVDKQTREL-VYINKTTNTQPTKPVLTMFNISGPIRSETRKNKFKRDRIKSKEHEQFDPLQRDW  82
    *****.       *...    . ..  **** .*        ..* ***** ***.*****.  ****.   *.***** .**.   *.*..

HC  SDKIDGFHDNIQYFKDEHYSVSCQNGSVLKSKFAKILKSRDYTDKKSIETYEKYCL-PQLVDKHNDCYVA--VCVLKPGFENG 162
T3  SDKIDGFHDNIQYFKDEHYSVSCQNGSVLKSKFAKILKSHDYTDKKSIETYEKYCL-PQLVDKHNDCYVA  VCVLKPGFENG 162
AC  SDQMDGFHDSIKYFKDEHYSVSCQNGSVLKSKFAKILKSHDYTDKKSIEAYEKYCL-PKLVDERNDYYVA--VCVLKPGFENG 162
HA  SDQLVGFQVSIKYFQDAQYWESCQIGSVLKSKFAKISKSHHYTDKKSIEAYEKYCL PKLVDERNEYYVA--VCVLKPGLENG 162
SL  SDQMDGFHDSIKYFKDEHYSVSSQNGSVLKSKFAKILKSQDYTDKKSIEVLLRNTVCPNLVDERNDYYVA--VCVLKPGFENG 160
LS  SDQMGGFHHSIKYFRDEHYSVRCQNRSVFKSKFGKILQSHDYADKKCIEAYGKFFL-PKF-GHRSGFYVALAVSVWKPGLENS 163
    **..  **.  .*.**.*..*   ..*   **.****.**  .*..*.***.**.     .   *..  .....  ***   *.* ***.**.

HC  SNQVLSFEEYNPIGNKVIVPFAHEINDTGLYEYDVLAYVDSVEFDGKQFEEFVQKLILPSSFNDSEKVLYYNEASKNKNMIYKA 216
T3  SNQVLSFEEYNPIGNKVIVPFAHEINDTGLYEYDVLAYVDSVEFDGKQFEEFVQKLILPSSFNDSEKVLYYNEASKNKNMIYKA 216
AC  SNQVLSFEEYNPIGNKVIVPFAHEINDTGLYEYDVVAYVDSVQFDGEQFEEFVQSLILPSSFKNSEKVLYYNEASKNKSMIYKA 216
HA  SNQVLSFEEYHPIGNKVIVPFAHEMNATGLHGYAVVAYVDSVQFDGEQAEELVQSLIWPSSVLSSAKVLYAGEAPASTRMIYKA 216
SL  SNQVLSFEEYNPIGNKVIVPFAHEINDTGLYEYDVVAYVDSVQFDGEQFEEFVQSLILPS FVQNRKVLYYNEASKNKSMIYKA 214
LS  SFQVLSFEEYNPDCYKVIVPFGHEIGVTGCLDDDVAAKQDSVEEERAKAENRVQSLMPPCCFKNSENLLSWGEASKNKSMWYNP 217
  * *******.*    ******.**..  **   .  .* *   ***.  .    .*.  **.*.  *.       . ..*   .**.  ...* *..

HC  LEFTTESSWVKSNKFNWKIFCNGFIYDKKSKALYVKLHNVTSTLNKNVILDMI -K      299
T3  LEFTTESSWVKSNKFNWKIFCNGFIYDKKSKALYVKLHNVTSTLNKNVILDMI--K      299
AC  LEFTTESSWGKSEKYNWKIFCNGFIYDKKSKVLYVKLINVTSALNKNVILNTI--K      299
HA  LEFTTETSWGKSEKYNWRIFCNGRIYDQKPKVVYVKLHNGTSALKRNAISNTS--K      299
SL  LEFTTESSWGKSEKYNWKIFCNGFIYDKKSKVLYVKLINVTSALNKNVILNTI--K      296
LS  KEFTTECRWPKSQNNNWKIFCNRFIYDKKRKVLYVKLHNVTSALNKNVIFNTIFLM      302
     ***** .* **..  **.****   ***.*.*..****** **.*..*.* .       .
```

图 5 杆状病毒 *p*35 蛋白的氨基酸同源序列分析

Fig. 5 Homology analysis of the *p*35 amino acid sequence of baculovirus

HC、T3、AC、HA、SL、LS：HycuNPV *p*35、BomoNPV T3 *p*35、AucaNPV *p*35、HearNPV *p*35、SpliNPV *p*35、LeseNPV *p*35 蛋白氨基酸序列

HC，T3，AC，HA，SL，LS：Amino acid sequence of HycuNPV *p*35，BomoNPV T3 *p*35，AucaNPV *p*35，HearNPV *p*35，SpliNPV *p*35，LeseNPV *p*35

3 讨论

杆状病毒中存在两类不同的细胞凋亡抑制基因，一种是编码分子量为 35 kD 蛋白的 *p*35 基因，另一种是编码细胞凋亡抑制蛋白的 *iap* 基因，研究表明这两种基因分别作用于细胞凋亡过程的不同阶段，阻抑细胞凋亡的机制也存在差别（Manji *et al.*，1997）。虽然 *p*35 基因在杆状病毒中具有一定的保守性，但并非所有杆状病毒均具有 *p*35 基因，在 GenBank 所登录的完整 NPV 基因组中，舞毒蛾核型多角体病毒（LydiNPV，*Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus，GenBank，AF081810）、黄杉毒蛾核型多角体病毒（OrpsNPV，*Orgyia pseudotsuyata* nucleopolyhedrovirus，GenBank，U75930）、甜菜夜蛾核型多角体病毒（SpexNPV，*Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus，GenBank，NC-002169）、苹淡褐卷蛾核型多角体病毒（EppoNPV，*Epiphyas postvittana* nucleopolyhedrovirus，GenBank，NC-003083）、小菜蛾颗粒体病毒（PlxyGV，*Plutella xylostella* granulovirus，GenBank，AF270937）、八字地老虎颗粒体病毒（XecnGV，*Xestia c-nigrum* granulovirus，GenBank，AF162221）的基因组中就未发现该基因的同源序列，而在这些核型多角体病毒中，存在着与 *p*35 基因功能相似的编码细胞凋亡抑制蛋白 *iap* 基因，因而可能在进化过程中，这些 NPV 的 *p*35 基因无需保留。

带有功能缺失的 *p*35 基因的 AucaNPV 突变系接种 SF-21 细胞后 12～24 h 之间引起大量细胞凋亡，而感染 TN-368 细胞则不然（Hershberger *et al.*，1992）；缺失 *p*35 基因的 BomoNPV T3 感染 BmN 细胞时，可诱发类似细胞凋亡的现象，但仍有相当数量的细胞能充分支持病毒的复制（Kamita *et al.*，1993）。HycuNPV *p*35 基因与 BomoNPV T3 *p*35 基因在核苷酸水平上有 99.9% 的同源性，在氨基酸水平上的同源性达 99.7%，且 *p*35 发挥功能必需的 C-末端 12 个氨基酸残基完全同源，病毒诱导的宿主 Caspase 在 *p*35 蛋白上的切割位点 D^{87}-G^{88} 也保守（Bertin *et al.*，1996），*p*35 蛋白抑制细胞凋亡的活力与 *p*35 蛋白的切割效率有关（Morishima *et al.*，1998），鉴于本测序样本 HycuNPV*p*35 基因与 BomoNPV T3 *p*35 基因在核苷酸水平的差异导致的氨基酸差异可能对 *p*35 蛋白的功能并非至关重要，推测 HycuNPV *p*35 蛋白的功能及抑制细胞凋亡的能力与 BomoNPV T3 *p*35 蛋白的相似。

参 考 文 献 (References)

Bertin J, Mendrysa S M, Lacount D J, Gaur S, Krebs J F, Armstrong R C, Tomaselli K J, Friesen P D, 1996. Apoptotic suppression by baculovirus *p*35 involves cleavage by and inhibition of a virus-induced CED-3/ICE-like protease. *J. Virol.*, 70: 6 251 – 6 259.

Cao G L, Xue R Y, Zhu Y X, *et al.*, 2001. Analysis and expression of *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus *sod* gene. *Acta Microbiologica Sinica*, 41 (2): 173 – 180. [曹广力，薛仁宇，朱越雄等，2001. 美国白蛾核型多角体病毒超氧化物歧化酶基因的序列分析和表达. 微生物学报，41 (2): 173 – 180]

Clem R J, Fechheimer M, Miller L K, 1991. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cell. *Science*, 254: 1 388 – 1 390.

Crook N E, Clem R J, Miller L K, 1993. An apoptotic genes of baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J. Virol.*, 67: 2 168 – 2 174.

Gong C L, Kobayasi J, Miyajima N, *et al.*, 1998. Nucleotide sequence analysis of the HcNPV cysteine protease gene. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 30 (3): 307 – 310. [贡成良，小林淳，宫岛成寿等，1998. HcNPV 半胱氨酸蛋白酶基因的核苷酸序列研究. 生物化学与生物物理学报，30 (3): 307 – 310]

Gong C L, Kobayasi J, Miyajima N, *et al.*, 1999. Sequence analysis of *Hyphantria cunea* nuclear polyhedrosis virus chitinase gene. *Chinese J. Virol.*, 15 (3): 260 – 269. [贡成良，小林淳，宫岛成寿等，1999. 美国白蛾核型多角体病毒几丁质酶基因核苷酸序列研究. 病毒学报，15 (3): 260 – 269]

Hershberger P A, Dickson J A, Friesen P D, 1992. Site-specific mutagenesis of the 35- kilodalton protein gene encoded by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: cell line-specific effects on virus replication. *J. Virol.*, 66: 5 525 – 5 533.

Kamita S G, Majima K, Maeda S, 1993. Identification and characterization of the *p*35 gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis. *J. Virol.*, 67: 455 – 463.

Manji G A, Hozak R R, Lacount D J, Friesen P D, 1997. Baculovirus inhibitor of apoptosis functions at or upstream of the apoptotic suppressor *p*35 to prevent programmed cell death. *J. Virol.*, 71: 4 509 – 4 616.

Morishima N, Okano K, Shibata T, Maeda S, 1998. Homologous *p*35 proteins of baculoviruses show distinctive anti-apoptotic activities which correlate with the apoptosis-inducing activity of each virus. *FEBS Lett.*, 427: 144 – 148.